評介 EPPO推薦之健康百合生產體系及其檢疫認證程序

◎農試所植病系　鄧汀欽

歐洲及地中海地區植物保護組織(European and Mediterranean Plant Protection Organization)簡稱EPPO或OEEP，設於法國巴黎。其主要任務之一即在防止有危險性的植物病蟲害在國際間蔓延，因此在充分考慮植物衛生安全(phytosanitory)的原則之下，EPPO協調其各會員國，試在觀賞作物中逐項提出共通的檢疫辦法，以便該地區農產品的流通。百合健康種原繁殖及檢疫的標準程序即是EPPO研擬出來並且已經公佈的其中一項。

近年本省百合栽培數量急遽增加，業者進口大量的種球，其中多數來自荷蘭，同時農林廳及農委會爲建立本土化之百合健康種球生產體系，在「加強球根花卉種球及生產技術改進」計畫中所採購的百合種球則源自美國，其間偶有品質不良，種球夾帶病蟲害的問題。然而國內對百合種球的健康檢定標準迄未建立，遇有紛爭仍無法據以解決，因此特別推介EPPO所協定的這一套程序，供國內健康種球繁殖體系及檢疫認證制度建立之參考。雖然EPPO的這套程序對業者不具拘束力，但是在國際百合種球交易時，都可據以擬定對我方較有利的契約條件。

健康百合生產體系

比照國內的無病毒優良種原三級繁殖制度，EPPO所推薦的健康百合種球生產程序分爲以下階段：

一、基本種(Nuclear stock)生產

1.愼選繁殖母球

新育成的品種或繁殖多年的老品種皆可選來當爲繁殖母球，但其必要條件除良好的園藝性狀外，必須毫無病毒病徵。如果無法得到這種材料，試用熱處理或生長點培養或兩者一起使用，讓植株再生，找出生長勢強的子株，再逐一測試觀察，通過基本種檢測標準，也可當爲基本種，但是先決條件是其園藝性狀及花卉品質必須保持一致，不容有所變異或退化。通常流通在外的舊有品種採來當繁殖種源時，必須經生長點培養，再生後脫除其中大多數的病蟲害。

2.基本種生產

選來當基本種母的材料必須在隔離的防蟲網室內單獨栽培於無土或滅菌的介質中，確保無任何病蟲害，尤其需要定期檢查是否有介殼蟲(*Phodococcus fascians*)，也需定期施藥以防

止鱗片產生細蟎(*Steneotarsonemus laticeps*)及蚜蟲(*Dysaphis tulipae*)。所有植株必須定期以目視檢查，在兩季的生長期中至少測試三次以確定無下列的任一病毒發生：

Arabis mosaic nepoviurs (ArMV)

Cucumber mosaic cucumovirus (CMV)

Lily Symptomless carlavirus (LSV)

Lily X potexvirus (LVX)

Tobacco rattle tobravirus (TRV)

Tobacco ringspot nepovirus (TRSV)

Tulip breaking potyvirus (TBV) (Lily strains)

其中最嚴重的是CMV，LSV，及TBV，而線蟲傳播的nepoviruses及tobraviruses有較大的寄主範圍，僅偶然發生在百合上，而且在生產過程中較容易將其去除，因此較不重要。根據推薦的測試方式，任何植物在一年內出現病徵或檢測結果是陽性反應的都必須去除，其餘的植株即可當爲基本種。

3.基本種的維持

基本種維持的植株繁殖條件和上述栽培條件同，但是必須在不同的溫室，而且必須與次級認證標準種原或其他可能存在感染源的地方距離50公尺以上。注意病蟲害防治，尤其需要注意蚜蟲及細蟎。栽培介質不可帶土，或無媒介病毒之線蟲(*Xiphinema, Trichodorus, Paratrichorus*, 及 *Longidorus*)。基本種每株每年需測試是否感染LSV，LVX及TBV，任何陽性反應者或呈現病徵者，應立刻去除。從基本種植株切下的組織砧木如果生長條件和基本種一樣，經過同樣的程序，通過LSV，LVX及TBV檢測，則仍然可以視爲基本種。正常情況下，基本種只繁殖一代（但有時可繁殖數代），其繁衍所得材料即爲原原種母。百合鱗片繁殖是最經濟的繁殖方式，遴選的每一種球之鱗片剝離下來後，播種在防蟲網室內，病蟲害防治條件和基本種的生長環境一樣。利用微體培養(micropropagation)繁殖種球也是可行的，但仍須經特別的檢查認證程序。

二、原原種(Propagation stock I)繁殖

必須在溫室內繁殖植株，其生長條件和基本種同，植株需定期目視檢查病蟲害病徵及逢機取樣檢測LSV，LVX及TBV，其繁衍所得的合格種球即爲原種母或直接當採種母用。

三、原種(Propagation stock II)田間繁殖

溫室內生產的原種母可以在田間繁衍數代後才當採種用。原種繁殖田必須符合採種標準，且無任何媒介病毒的線蟲存在，與同屬之任何採種田必須至少保持50公尺之隔離距離。注意病蟲害防治，需定期田檢及逢機檢測LSV，LVX及TBV。植株親源必須詳細記錄，才能得知採種材料是源自那一個基本種，繁殖幾代，什麼環境條件下生產的。

這個時期的繁殖工作可交給註冊在案的專門機構負責。

四、採種(Certified stock)

原原種在溫室生產出來的種球或原種在田間繁殖的種球皆可再繁殖成爲採種。採種田需與一般百合栽培園距離2公尺以上，而且前四年未種過百合，若有種過則須將田土作燻蒸處理。採種植株需定期田檢及逢機取樣檢測LSV，LVX及TBV。此階段的採種工作不需經由專門機構負責，任何業者事先申請經官方認可，其生產條件符合採種要求，而病原檢測合格者，其產品皆可視爲採種而予認證。

以上各階段的生產過程中，隨時要注意品種純度，避免變異或退化現象的產生。

各級種原繁殖機構與業者之註冊與認可

只要符合條件者事先申請，經官方認可，各級繁殖工作都可交給註冊在案的專門機構或業者負責。其一般條件是登記許可每年頒發一次，到期必須重新申請，參與者必須遵守檢疫驗證規定，聲明作物所在位置，在生長時期隨時接受官方檢查。其中根據業者的設備程度，將之分爲'A','B','C'三級：

'A'級生產者—業者被授權在溫室內繁殖基本種及原原種。條件是：

1)使用許可的生產方法，具備必要的器材和訓練有素的操作員。如果生長點組織培養是轉包給其他有關的實驗室，這點也必須註冊。

2)提供一個完全隔離而封閉的空間以符合基本種生產條件。

3)提供另外隔離而封閉的空間以繁殖植株，因此基本種繁殖、保存及原原種繁殖都分散在不相連的地方進行，以符合上述種原生產要件。

4)具有必要之設備，以便在百合種球的生產及繁殖時期，有效執行病原檢測，執行人員必須有充分的生物學及血清學試驗經驗。如果生物學及血清學試驗是轉包他人執行，相關的實驗室也必須註冊。

5)生產過程中有應用到微體培養(micropropagation)，使用特定的設備，或轉包給專業實驗室執行，其相關項目都必須註冊。

'B'級生產者 — 業者承接'A'級生產者所提供之材料，在田間繁殖原種，其生產條件符合原種繁殖要求者。

'C'級生產者 — 業者承接'A'級或'B'級生產者所提供之材料，在田間繁殖以供採種，其生產條件需符合採種要求者。

感染百合病毒之種類及檢測

一、各類病毒適用之偵測方法

1. Nepoviruses

ArMV及TRSV單獨感染百合時並無病徵呈現，因此無法以目視法觀察病徵，較可靠的偵測方式是利用ELISA及ISEM。

2. Cucumovirus 及 Tobravirus

CMV及TRV單獨感染百合亦無特殊的病徵產生，因此最好的偵測方式是ELISA及ISEM。

3. Potyviruses

TBV可利用血清試驗(ELISA或ISEM)偵測出來，或利用指示植物 *Lilium formosanum* 接種試驗測出病毒之存在。至少有3種型系(strains)的TBV感染百合。

4. Carlavirus and Potexvirus

LSV及LVX偵測及鑑定的最佳方法是ELISA及ISEM。

一、指示植物接種試驗

1. 供試植物栽培

以種子播種，三週後移植，栽種在20－25°C充分照光(至少12小時)的環境下。*Chenopodium spp.* 及 *Nicotiana* spp.是最常用的材料，餘見表一，通常是在播種後五週，植株長有4－6片葉時最適接種。

2. 機械接種

供試材料以3倍量0.05M磷酸緩衝液(PH 7.6)淬取汁液，磨擦接種至供試植物，每株至少接種兩片葉子。標示後置於溫室最少三週，植株間避免接觸。

3. 病徵觀察

病徵特性在某種程度可當病毒的鑑定依據

表一　偵測百合病毒的指示植物之適用範圍

	病毒種類						
指示植物	ArMV	CMV	LSV	LVX	TRV	TRSV	TBV
Chenopodium amaranticolr	+	+			+	+	
Chenopodium murale				+			
Chenopodium quinoa	+	+				+	+
Cucumis sativus	+	+			+	+	
Lilium formosanum							+
Lilium longiflorum			+				
Nicotiana benthamiana		+					
Nicotiana clevelandii	+	+			+	+	
Nicotiana glutinosa		+					
Nicotiana tabacum		+				+	
Phaseolus vulgaris	+				+	+	
Tetragonia expansa				+			
Tulipa gesneriana			+				

ArMV:Arabis mosaic nepovirus
CMV:Cucumber mosaic cucumovirus
LSV:Lily Symptomless carlavirus
LVX:Lily X potexvirus
TRV:Tobacco rattle tobravirus
TRSV:Tobacco ringspot nepovirus
TBV:Tulip breaking potyvirus

，但是必要時還需經由ELISA或ISEM來確認，因爲不是只有該種病毒才會在指示植物上造成病徵。

三、ELISA（免疫酵素分析）

一般常用的夾層抗體法免疫酵素分析（Clark & Adam, 1977），稍加修正，即可用來分析百合及指示植物葉片榨汁中的病毒。

四、ISEM（免疫電子顯微鏡檢查）

標準的免疫電子顯微鏡檢查方式（Miline & Luisoni, 1977）可用來偵測及鑑定百合及指示植物中的病毒。

百合檢疫認證標準

一、基本種 Nuclear stock

所有植株在病毒檢測時，對所有的病毒都是陰性反應，無任何植株呈現病蟲害病徵，否則不予認證。尤其種球若有細蟎（*Steneotarsonemus laticeps*）發生，必須熱水處理，繁殖兩年不再出現病徵，才可再申請檢驗認證。

二、原原種Propagation stock I

條件和基本種一樣，但是不必逐株檢測，其認證標準是根據逢機取樣的結果。

三、原種 Propagation stock II

田間繁殖的生長期有過田檢且植株被逢機取樣測定病毒，如果種球交易換手，則在採收後進行種球檢測。檢查結果病蟲害罹病率若超過容許標準（表二），則不予認證。

表二　原種檢查容許標準

病蟲害種類	田間檢查	種球檢查
具嚴重之病毒病徵	0.05%	—
具輕微之病毒病徵	0.5%	—
根腐(*Sclerotinia, Penicillium, Fusarium*)	—	0.5%
菌核(*Sclerotia*)	—	4.5%(三個樣本以上)
蚜蟲(*Dysaphis tulipae*)	0	0
細蟎(*Steneotarsonemus laticeps*)	0	0
介殼蟲(*Rhodococcus fascians*)	0	0

表三　採種檢查容許標準

病蟲害種類	田間檢查	種球檢查
具嚴重之病毒病徵	2%	0.5%
根腐(*Sclerotinia, Penicillium, Fusarium*)	—	2.0%
菌核(*Sclerotia*)	—	4.5%(三個樣本以上)
細蟎(*Steneotarsonemus laticeps*)	—	4.5%
介殼蟲(*Rhodococcus fascians*)	0	0

四、採種Certified stock

生長期植株及儲藏期種球有過田檢且逢機取樣測定病毒，如果病蟲害罹病率超過容許標準（表三），則不予認證。

檢討與建議

百合健康種球繁殖體系成功的關鍵在於病蟲害的徹底防除，其中病毒病害不易偵測且蔓延極廣，成爲生產的限制因子，所以在各級種原的檢疫認證都必須通過病毒檢測。爲求週延，EPPO設定七種病毒爲基本種檢疫認證的標的，其他次級種原則僅檢測三種病毒。至於其他病蟲害的發生測定則僅止於田檢或抽樣目視檢查，因此在這個體系內已存在的問題及本省全盤沿用可能發生的問題，玆分述如下：

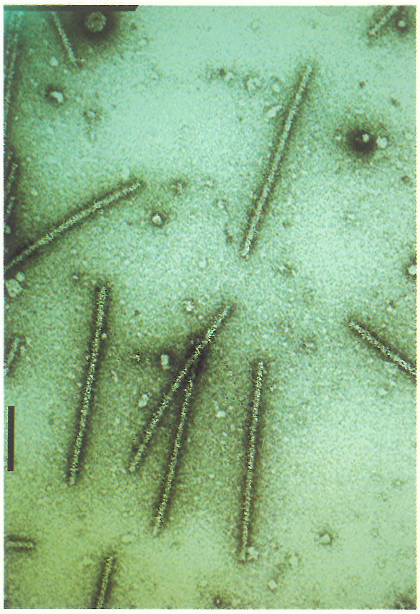
一、基本種檢測的七項病毒中，ArMV、TRV、TRSV及LVX僅散見在研究報告中，其發生在百合上也只有報告中的種或品種，並無後續的全面發生報告，因此是否値得列爲病毒檢定項目仍須斟酌。否則報告中已有的百合病毒包括citrus tatter leaf virus (Inouye, et al. 1979),broad bean wilt virus, narcissus mosaic virus (Chang & Chung 1987)， 及 strawberry latent ringspot virus (Cohen, et al. 1995)等是否也要依例列入檢測？

二、CMV，LSV，及TBV雖然被公認是最嚴重而必須嚴防的病毒種類，但是在基本種以外的各級種原繁殖並不把CMV偵測包括在內，反倒是LVX在每一級種原繁殖時都被嚴格檢測，事實上LVX的檢測雖然已可利用核酸分析如PCR等方法來加以確定，但是以LVX的原始鑑定依據卻很薄弱(Stone 1980)，美國至今尙未有LVX的發生報告，我們是否可棄LVX而加強CMV的檢測以符合實際需要？

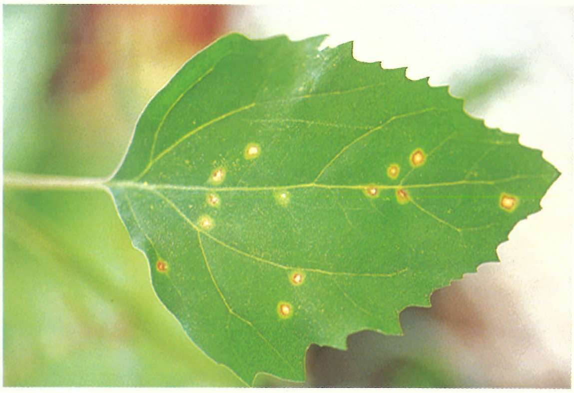
三、CMV不論在美國或台灣都是極重要之病毒，其與LSV混合感染造成的necrotic fleck摧毀了早期美國東南地區的百合產業，EPPO爲何忽視此一事實，而在原原種及以下的種原檢測都不包括CMV，這樣我們如何相信其檢疫的結果？

四、大多數的病毒單獨感染百合都不呈現病徵，即使有病徵也會隨環境、品種、株齡及栽培時期而異，而且其他因素造成類似的病毒病徵亦時有所聞，在此情況下田間目視檢查的可靠性有多大？

五、Potyviruses的診斷與鑑定是極大的困擾，雖然近百年來許多報告已認定TBV是造成百合嵌紋病的一種長絲狀病毒，而且可以接種到L. formosanum上顯現非常明顯的病徵，可是我們利用號稱可以偵測TBV的商業診斷試劑卻毫無作用，美國農部製備的單元抗體在TBV的偵測使



利用ISEM檢查之LSV病毒型態

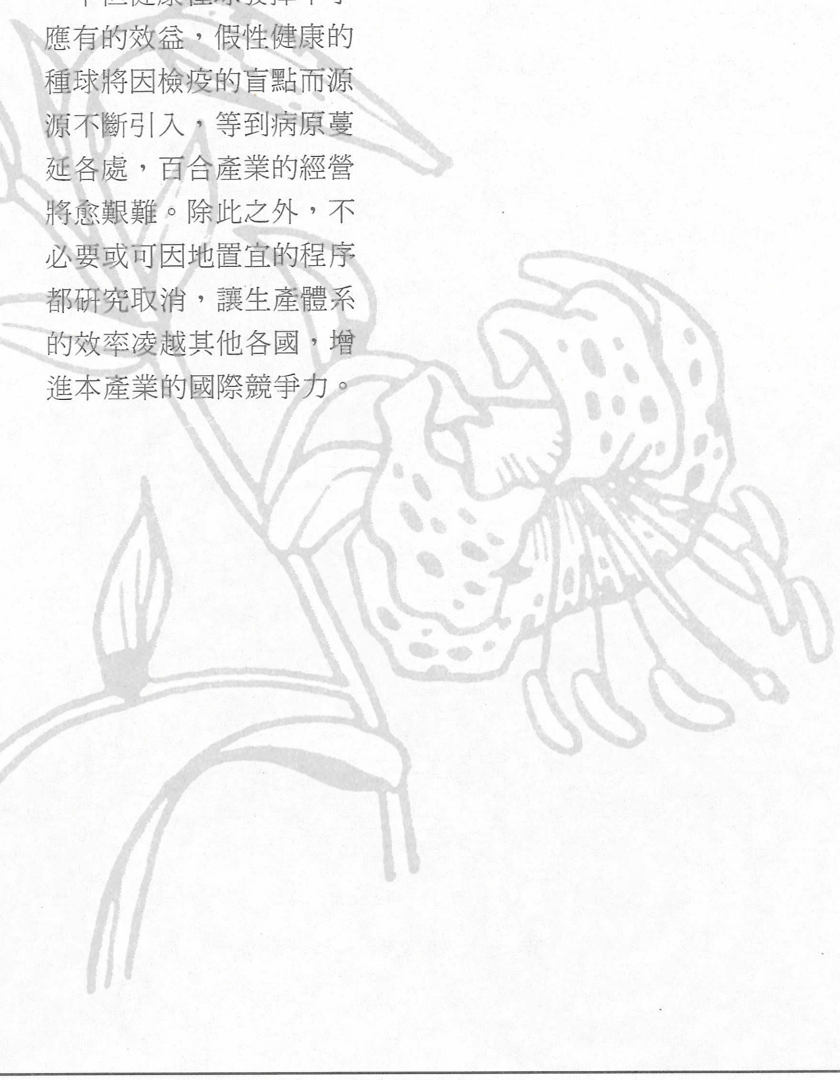


接種*Chenopodium amaranticolor*檢測百合CMV之結果

接種*Lilium formosanum*檢測百合TBV之結果

隨百合種球蔓延的蚜蟲

用上也有所限制。因此荷蘭球根研究中心再根據核酸分析的結果，認爲百合嵌紋病毒（Lily mottle virus, LMoV）才是主要的病原，而且LMoV是與TBV完全不同的病毒。可是目前爲止，在美國尚無法照荷蘭報告所述，從接種的*N.benthamiana*分離到感染百合的所謂LMoV，而在台灣似有多種potyviruses感染百合，造成更複雜的病徵，在此情況下如何擬定被國際認定的檢疫標準？而商業診斷試劑所費不貲，但測不到TBV，是否還要繼續使用？其檢定結果是否足以認證健康種球？

六、介殼蟲(*Rhodococcus fascians*) 細蟎 (*Steneotarsonemus laticeps*) 及蚜蟲 (*Dysaphis tulipae*) 列爲檢查項目，在台灣可能要改爲其他蟲害，至於*Fusarium*及其他土壤病害污染種球是否要列爲各級種原檢查的重點？灰黴病及其他因素造成植株生長不正常到什麼程度就應拒絕採種認證？

上述各項問題實有待積極解決，否則以EPPO的程序照單全收，運用在本土化球根花卉生產體系，將徒然浪費人力與物力，不但健康種球發揮不了應有的效益，假性健康的種球將因檢疫的盲點而源源不斷引入，等到病原蔓延各處，百合產業的經營將愈艱難。除此之外，不必要或可因地置宜的程序都研究取消，讓生產體系的效率凌越其他各國，增進本產業的國際競爭力。